



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of : **Confirmation No. 3187**
Shinichiro ISOBE : Docket No. 2004_0569A
Serial No. 10/822,775 : Group Art Unit
Filed April 13, 2004 : **Mail Stop: Missing Parts**

METHOD OF DETECTING BIOLOGICAL
MOLECULES, AND LABELING DYE AND
LABELING KIT USED FOR THE SAME
[as amended]

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC 119

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicants in the above-entitled application hereby claim the date of priority under the International Convention of Japanese Patent Application No. 2003-427268, filed December 24, 2003, and Japanese Patent Application No. 2004-105187, filed March 31, 2004, as acknowledged in the Declaration of this application.


Certified copies of said Japanese Patent Applications are submitted herewith.

Respectfully submitted,

Shinichiro ISOBE

THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED
TO CHARGE ANY DEFICIENCY IN THE
FEES FOR THIS PAPER TO DEPOSIT
ACCOUNT NO. 23-0975

By


Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicant

WMC/kes
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
August 24, 2004

2004-0569A
1303E

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 2 7 2 6 8
Application Number:

[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 2 7 2 6 8]

出 願 人
Applicant(s): 磯部 信一郎
 又賀 駿太郎
 竹中 繁織

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

2 0 0 4 年 4 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫

【書類名】 特許願
【整理番号】 192289
【提出日】 平成15年12月24日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12N 15/09
C07K 1/13

【発明者】
【住所又は居所】 福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9 - 2 8 - 1 2
【氏名】 礪部 信一郎

【特許出願人】
【住所又は居所】 福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9 - 2 8 - 1 2
【氏名又は名称】 礪部 信一郎

【特許出願人】
【識別番号】 501415556
【住所又は居所】 福岡県大野城市大池 2 丁目 1 7 番 5 号
【氏名又は名称】 又賀 駿太郎

【特許出願人】
【識別番号】 399045950
【住所又は居所】 福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1
【氏名又は名称】 竹中 繁織

【代理人】
【識別番号】 100086405
【弁理士】
【氏名又は名称】 河宮 治
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】
【識別番号】 100091465
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 久夫
【電話番号】 06-6949-1261
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 163028
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

生体高分子試料と有機EL色素とを反応させ、該有機EL色素で標識された該生体高分子試料の蛍光を測定する生体高分子の検出方法。

【請求項 2】

上記生体高分子試料が、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか 1 種である請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

上記生体高分子と反応させるに先立って、上記有機EL色素に、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか 1 種の官能基を導入する請求項 1 又は 2 に記載の検出方法。

【請求項 4】

上記生体高分子試料が核酸であって、プローブ核酸をマイクロアレイに固定する一方、試料である標的核酸を上記有機EL色素と反応させて標識し、該標識された標的核酸を上記マイクロアレイにスポットしてハイブリダイゼーションを行う請求項 2 又は 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

生体高分子を標識する有機EL色素又はその誘導体を含む生体高分子用標識キット。

【請求項 6】

上記生体高分子が、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか 1 種である請求項 5 記載の標識キット。

【請求項 7】

上記誘導体が、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか 1 種の官能基を含んでなる請求項 5 又は 6 に記載の標識キット。

【書類名】明細書**【発明の名称】** 生体高分子の検出方法及びそれに用いる標識キット**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、蛍光色素を用いる、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類等の生体高分子の検出方法及びその検出方法に用いる標識キットに関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

現在、世界的に特定遺伝子解析技術、遺伝子治療、テーラーメイド医療を目的としたポストゲノム研究が盛んに行われている。遺伝子解析技術としては、例えば、DNAマイクロアレイを用いたDNAの検出方法が用いられている。この検出方法によれば、多種類の遺伝子発現、機能性、変異等の同時解析を簡便かつ迅速に行うことができる。

DNAマイクロアレイを用いた検出方法は、多数のDNA又はオリゴヌクレオチドの配列（プローブ核酸）を、ガラス又はシリコン等の基板上にスポット固定したDNAチップを用いる。基板上に固定したプローブ核酸と、標識した試料RNA（標的核酸）とのハイブリダイゼーションによりプローブ核酸と相補的な塩基配列を有する標的核酸が選択的にプローブ核酸と結合する。そしてマイクロアレイを乾燥後、標識された標的核酸の蛍光強度を測定する。

標識には、蛍光色素が広く使用されており、高い蛍光強度を有すること、乾燥状態（固体状態）でも発光すること、そして水溶性を有することなどが要求されている。蛍光色素としては、例えば、Cy3やCy5が使用されている（非特許文献1）。

【非特許文献1】 Science 283, 1, January, 1999, 83-87

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0 0 0 3】**

しかしながら、Cy3やCy5は、高い蛍光強度を有し、固体状態でも発光する利点を有するが、非常に高価であるため、検出方法が高コストにならざるを得ない。また、試料RNA中への取り込み率が低く、試料RNAに対して十分な標識ができないため検出感度が十分でないという問題もある。これに対し、Cy3やCy5に代わる蛍光色素が見出されていないのが現状である。

そこで、本発明は、上記課題を解決し、より低コストで高感度の生体高分子の検出方法を提供することを目的とした。

【課題を解決するための手段】**【0 0 0 4】**

本発明者は、Cy3やCy5に代わる蛍光色素を探索する過程において、有機EL素子に使用されている有機EL色素が、生体高分子の標識として用いた場合、高い蛍光強度を有することを見出して本発明を完成させたものである。

すなわち、本発明の生体高分子の検出方法は、生体高分子試料と有機EL色素とを反応させ、該有機EL色素で標識された該生体高分子試料の蛍光を測定することの特徴とする。

【0 0 0 5】

また、上記生体高分子試料には、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか1種を用いることができる。

【0 0 0 6】

また、上記生体高分子と反応させるに先立って、有機EL色素に、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を導入することができる。

【0 0 0 7】

また、上記生体高分子試料に核酸を用い、プローブ核酸をマイクロアレイに固定する一方、試料である標的核酸を有機EL色素と反応させて標識し、その標識された標的核酸をマイクロアレイにスポットしてハイブリダイゼーションを行うこともできる。

【0008】

本発明の生体高分子用標識キットは、生体高分子を標識する有機EL色素又はその誘導体を含むことを特徴とし、生体高分子には、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか1種を用いることができる。また、上記誘導体が、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を含むものを用いることができる。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、生体高分子の標識試薬として有機EL色素を用いることにより、以下のような効果が得られる。

すなわち、有機EL色素は固体状態（固体及び半固体を含む）で高い量子収率を有しており高い蛍光強度を有している。さらに、有機EL色素はCy3やCy5に比べ安価であるので、より低コストで生体高分子の検出を行うことができる。また、有機EL色素は生体高分子とは定量的に反応し、高い取り込み率を有しているため、高い検出感度を得ることができる。また、蛍光波長の選択の自由度が増加し、オレンジ、イエロー、グリーン、ブルーなど多くの蛍光波長を用いることができる。これにより、ストークスシフトの大きい（励起波長と蛍光波長の差が大きい）2種以上の蛍光色素を用いることが可能となるので、一つの試料中に含まれる複数の標的核酸を同時に検出することも可能となる。また、Cy3やCy5は冷凍保存する必要があるのに対し、有機EL色素は化学的に安定であり、常温での長期保存に耐えることができるので、取り扱いが容易である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明に用いる有機EL色素は、一对の陽極と陰極との間に固体状態で挟持され、陽極から注入された正孔と陰極から注入された電子とが再結合する際のエネルギーにより発光可能な色素であれば特に限定されない。例えば、テトラフェニルブタジエンやペリレン等の多環芳香族化合物、シクロペンタジエン誘導体、オキサジアゾール誘導体、クマリン誘導体、ジスチリルピラジン誘導体、アクリドン誘導体、キナクドリン誘導体、スチルベン誘導体、オキサゾロピリジン誘導体、イミダゾール誘導体、オキサ（チア）ジアゾロピリジン誘導体、チアジアゾール誘導体、そしてテトラフェニルチオフェン誘導体等を用いることができる。さらに、分子内にカルボン酸基を有し、又はカルボン酸基を導入可能な色素であることが好ましい。以下に述べるように、生体高分子と結合するための反応性基の導入を容易に行うことができるからである。

【0011】

有機EL色素は、生体高分子試料（以下、標的高分子という）と結合するための反応性基を有することが好ましく、その反応性基には、標的高分子のアミノ基と反応可能な官能基を有するものが好ましい。その官能基には、例えば、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種を用いることができる。好ましくはトリアジン基、カルボジイミド基又は活性エステル化したカルボニル基であり、標的高分子のアミノ基とアミド結合を形成することができる。

例えば、活性エステル化したカルボニル基には、N-ヒドロキシースクシンイミドエステルやマレイイミドエステルを用いることができる。N-ヒドロキシースクシンイミドを用いることにより、以下のスキーム1の上式に示すように、縮合剤としてDCCを用いることによりN-ヒドロキシースクシンイミドエステル体を経由してアミド結合によりEL色素と標的高分子が結合する。また、スキーム1の下式に示すように、活性エステル化したカルボニル基には、トリアジン誘導体を用いることもできる。

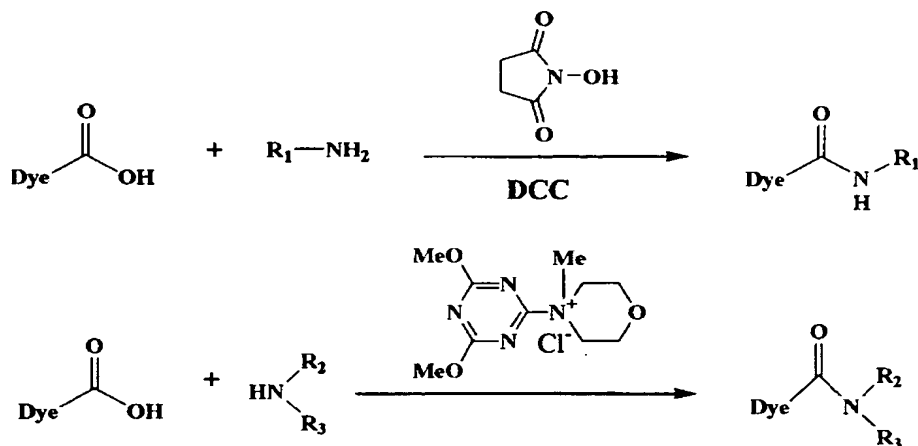
また、カルボジイミド基には、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）や1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド等のカルボジイミド試薬を用いるこ

とができる。カルボジイミド体を経由してアミド結合によりEL色素と標的高分子を結合させることができる。

また、有機EL色素の置換基を変えることにより、励起波長及び発光波長を変化させることができるので、多色化により多種類の試料の同時検出を行うこともできる。

【0012】

【化1】



スキーム 1.

なお、標的高分子がDNAの場合にはオリゴDNA末端に修飾されたアミノ残基と、タンパク質の場合にはアミノ残基と、ペプチド類の場合にはポリペプチドのアミノ基と、例えばポリリシン誘導体のアミノ残基と、そして糖類の場合には多糖類誘導体骨格内のアミノ基と反応性基を結合させることができる。

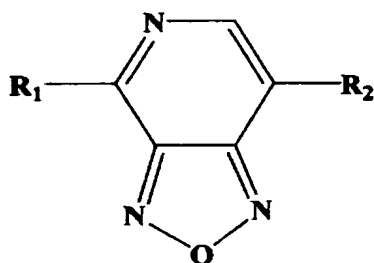
【0013】

本発明の検出方法に用いる好ましい有機EL色素としては、以下のものを挙げることができる。

1. 以下の一般式で表されるオキサゾロピリジン誘導体

【0014】

【化2】



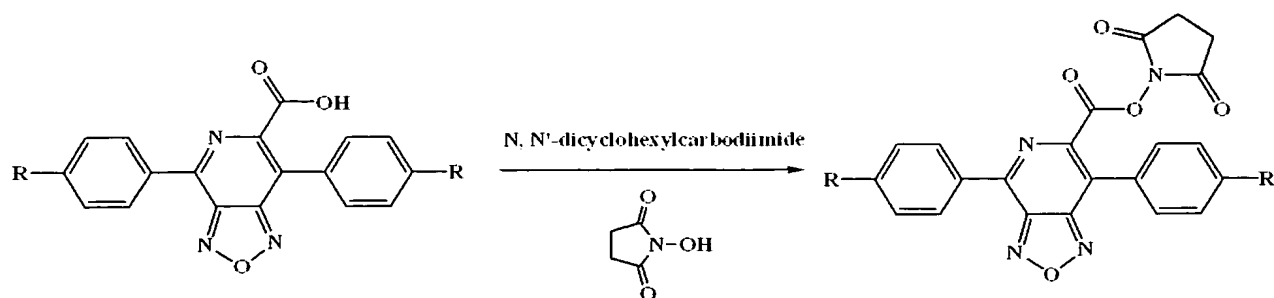
(式中、R₁とR₂はそれぞれ独立して置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基を示す。)

【0015】

オキサゾロピリジン誘導体は、そのカルボン酸誘導体を合成後、例えば、以下のスキーム2に示す反応により、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を縮合剤として用い、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを含む活性エステル体へ誘導したものをを用いることができる。

【0016】

【化3】



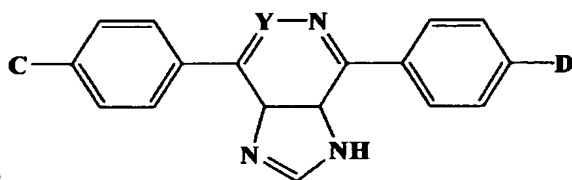
スキーム 2.

【0017】

2. 以下の一般式で示されるイミダゾール誘導体

【0018】

【化4】



2

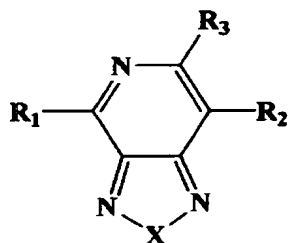
(式中、C、Dは、カルボキシル基を含む、他の置換基を有しても良い芳香族炭化水素基または複素環基またはヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示し、CとDは同じでも異なってもよい。Yは、カルボキシル基を有していてもよい炭素原子を示す。)

【0019】

3. 以下の一般式で示されるオキサ（チア）ジアゾロピリジン誘導体

【0020】

【化5】



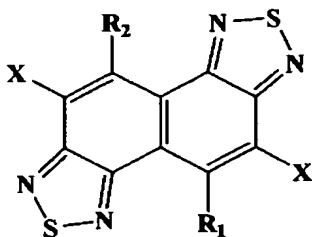
(式中、R₁、R₂、R₃およびR₄はそれぞれ独立して置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基を示し、Xは置換基を有していてもよい窒素原子、置換基を有していてもよい硫黄原子、置換基を有していてもよい酸素原子または置換基を有していてもよいセレン原子を示し、R₃は水素原子、シアノ基、カルボキシル基、置換基を有していてもよいアミド基、置換基を有していてもよいエステル基、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示す。)

【0021】

4. 以下の一般式で示されるチアジアゾール誘導体

【0022】

【化 6】



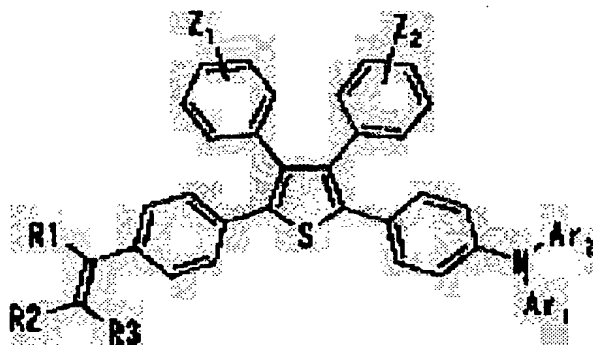
(式中、 R_1 および R_2 は、水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、ニトロ基、カルボキシ基、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアラルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよいアミド基、置換基を有していてもよいアルコキシ基、置換基を有していてもよいアルコキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルコキシスルホニル基、置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示し、 X は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基またはヒドロキシ基を示す。)

【0 0 2 3】

5. 以下の一般式で示される2,3,4,5-テトラフェニルチオフエン誘導体1

【0 0 2 4】

【化 7】



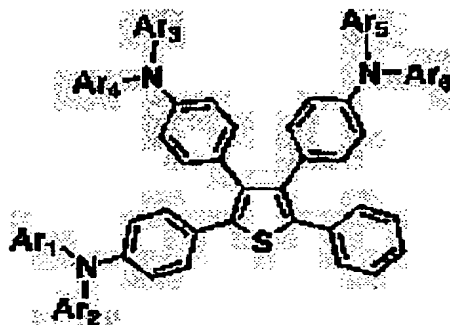
(式中、 $R_1 \sim R_3$ はそれぞれ独立に、水素原子、直鎖、分岐または環状のアルキル基、置換または未置換のアリール基、あるいは置換または未置換のアラルキル基を表し、 Ar_1 および Ar_2 は置換または未置換のアリール基を表し、さらに、 Ar_1 と Ar_2 は結合している窒素原子と共に含窒素複素環を形成してもよい、を表し、 Z_1 および Z_2 は水素原子、ハロゲン原子、直鎖、分岐または環状のアルキル基、直鎖、分岐または環状のアルコキシ基、置換または未置換のアリール基、置換または未置換のアラルキル基、あるいは置換または未置換のアミノ基を表す。)

【0 0 2 5】

6. 以下の一般式で示される2,3,4,5-テトラフェニルチオフエン誘導体2

【0 0 2 6】

【化8】



(式中、Ar₁～Ar₆はそれぞれ独立に、置換または未置換のアリール基を表し、さらに、Ar₁とAr₂、Ar₃とAr₄およびAr₅とAr₆は結合している窒素原子と共に含窒素複素環を形成している。)

【0027】

本発明の検出方法は、標識された固体あるいは半固体状態の生体高分子の蛍光を測定する検出方法であれば、あらゆる検出方法に適用することができる。例えば、DNAマイクロアレイを用いる遺伝子解析に用いる場合、以下の手順で行うことができる。

基板に固定するプローブ核酸には、遺伝子の発現を調べる場合、cDNA等をcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリー又は全ゲノムをテンプレートとしてPCR法により増幅して調製したものを用いることができる。また、遺伝子の変異等を調べる場合、標準となる既知の配列をもとにして、変異等に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成したものを用いることができる。

【0028】

プローブ核酸の基板上への固定は、核酸の種類や基板の種類に応じて適当な方法を選択することができる。例えば、DNAの荷電を利用し、ポリリシン等の陽イオンで表面処理した基板に静電結合させる方法を用いることもできる。

【0029】

一方、標的核酸と有機EL色素を混合して反応させることにより、有機EL色素により標識された標的核酸を調製する。反応温度は室温～60℃、反応時間は2～48時間で行うことが好ましい。

【0030】

次いで、標識された標的核酸を基板上にスポットし、ハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは、室温～70℃、そして2～48時間の範囲で行うことが好ましい。ハイブリダイゼーションにより、プローブ核酸と相補的な塩基配列を有する標的核酸が選択的にプローブ核酸と結合する。その後、基板を洗浄して、室温で乾燥する。

【0031】

次いで、乾燥した基板の表面の蛍光強度を蛍光レーザスキャナ法により測定する。蛍光強度により、遺伝子発現のレベルをモニタリングすることができる。

【0032】

本発明の標識キットは、生体高分子を標識する有機EL色素又はその誘導体を含むが、必要により色素を対象とする生体高分子と反応させるための、試薬、酵素、溶媒等を含むことができる。対象とする生体高分子は、核酸、タンパク質、ペプチド類、又は糖類である。また、有機EL色素は、生体高分子のアミノ基と反応する官能基を有する誘導体であることが好ましく、その官能基を例示すると、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種であることが好ましい。さらに好ましくは、トリアジン基、カルボジイミド体又は活性エステル化したカルボニル基を含む活性エステル体を有機EL色素の

誘導体として含むことが好ましい。

【実施例】

【0033】

以下、実施例を用いてさらに詳細に本発明について説明する。

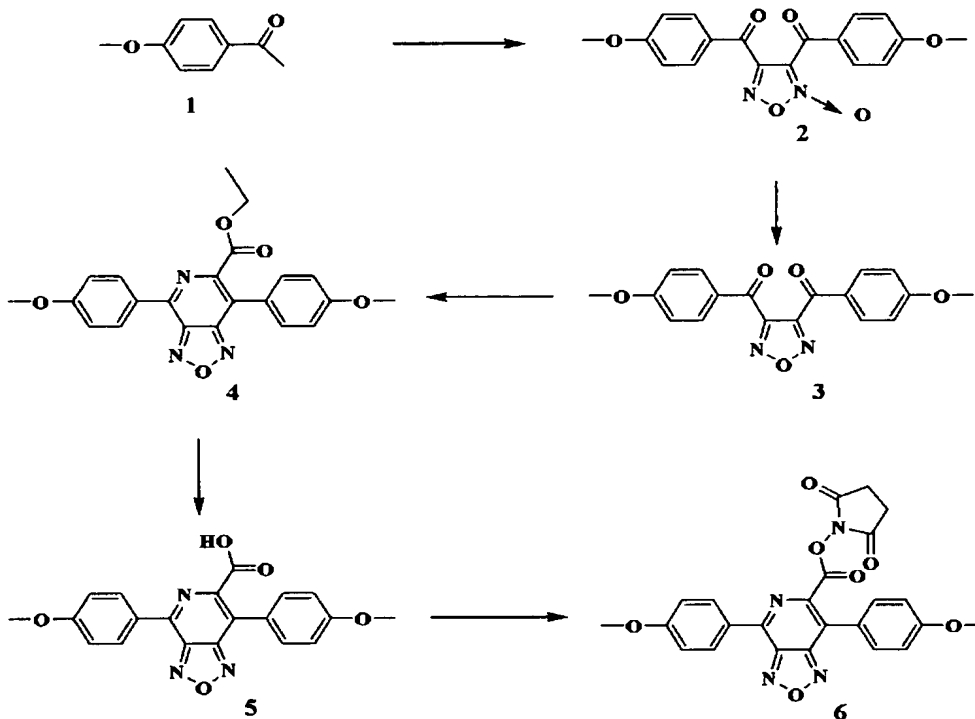
合成例 1.

有機EL色素として1, 2, 5,-オキサジアゾロ-[3, 4-c]ピリジン誘導体を用いた。

以下に、1, 2, 5,-オキサジアゾロ-[3, 4-c]ピリジンの活性エステル体の合成スキームを示す。

【0034】

【化9】



スキーム 3.

【0035】

(1) ジケトン誘導体2の合成

500mL三口フラスコに4-メトキシアセトフェノン(1) 37.5 g (0.25 mol)、亜硝酸ナトリウム0.15 gを酢酸100 mLに溶解した。水浴中、HNO₃ 100 mLを酢酸100 mLに溶解したものを2時間かけて滴下した。その後、室温で2日間攪拌した。反応混合物を500mLの水にゆっくりと入れ、沈殿物を生成させた。沈殿物は濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を飽和重曹水で洗浄し、10% NaCl 水溶液で2回洗浄した。MgSO₄で脱水した後、減圧下、クロロホルムを留去し、オキサジアゾール-N-オキサイド2を34.5 g (収率78%)で得た。

【0036】

(2) ジケトン誘導体3の合成

500mL三口フラスコにオキサジアゾール-N-オキサイド2 17.7 g (0.05 mol)をアセトニトリル400 mLに溶解した。それにZn 12.0 g、AcOH 7 mL、Ac₂O 20mLを添加した。水浴中で反応温度が30℃を超えないように冷却した。12時間攪拌して反応終点とした。反応混合物を濾過し、不溶分を除去した。アセトニトリルを減圧下留去して残渣を得た。残渣をクロロホルムで再結晶し、オキサジアゾール-N-オキサイド3を10.2 g (収率60%)で得た。

【0037】

(3) オキサゾロピリジンエチルエステル4の合成

500mL三口フラスコでオキサジアゾール-N-オキサイド3 15.6 g (0.046 mol)をブタノール300 mLに溶解した。そこへグリシンエチルエステル塩酸塩 32.0 g (0.23 mol)を添加した。24時間加熱還流を行った。ブタノールを減圧下留去し、残渣を得た。残渣を200mLのクロロホルムに溶解し、10% HCl、飽和NaHCO₃、10%NaClで洗浄した。MgSO₄で乾燥し、溶媒を留去した。得られた残渣をクロロホルムで再結晶し、オキサジアゾロピリジンエチルエステル 4 を13.0 g (収率 70%)で得た。

【0038】

(4) オキサゾロピリジンエチルエステル4の加水分解

500mL三口フラスコでオキサジアゾロピリジンエチルエステル 4 3.0 g (0.007 mol)を200 mLのエタノールに溶解した。そこへKOH 0.62 g (0.01 mol)を添加した。5時間加熱還流を行った後、反応混合物を200 mLの水へ添加した。この水溶液に濃塩酸を滴下してpH 1に調整したところ沈殿が生じた。沈殿物を濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を10% NaHCO₃水溶液、水で洗浄した。クロロホルムを留去して残渣を得た。残渣を水-エタノール (1:1)で再結晶し、2.1 g (収率 81%)のオキサジアゾロピリジンカルボン酸 5 を得た。

【0039】

活性エステル6の合成

50 mL 三口フラスコでオキサジアゾロピリジンカルボン酸 5 1.0 g (0.0026 mol)とN-ヒドロキシスクシンイミド0.30 g (0.0026 mol)をDMF 20mLに溶解した。これにN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド 0.54 g (0.0026 mol)を30分かけて滴下した。滴下後、室温で30時間攪拌した。減圧下、DMFを留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム) で単離精製し、オキサジアゾロピリジン活性エステル体 6 を0.76 g (収率62%)得た。

【0040】

実施例 1.

〈オリゴヌクレオチドの色素標識及び検出〉

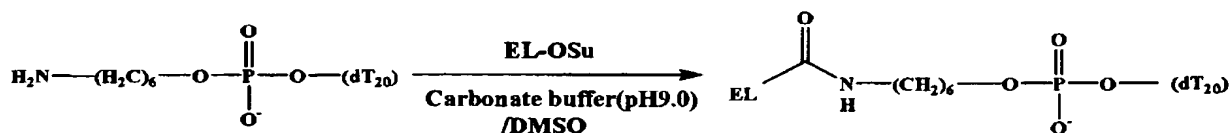
【0041】

1. オリゴヌクレオチドの色素標識

オリゴヌクレオチドの色素標識は、以下のスキーム 4で行った。

【0042】

【化10】



スキーム 4.

【0043】

(実験操作)

H₂N-dT₂O (40 mmol)を含むNa₂CO₃/NaHCO₃ buffer (pH 9.0) 40 μlに、有機EL色素の活性エステル5.0 μmol (2.4 mg)を含む無水 DMSO溶液12 μlを加えて室温で6時間振とうした。振とう後、全量が1mlになるように0.1M TEAA (triethylamine-acetic acid) buffer (pH 7.0)を加え、NAP-10カラム (Pharmacia Sephadex G-25)を用いてオリゴヌクレオチドに由来する成分を分取した。その際、NAP-10カラムはあらかじめ0.1M TEAA buffer 15mlで平衡化させた後使用した。全量が1mlになるようにメスアップした試料をカラムに充填し、1mlの溶液が溶出した後、0.1M TEAA bufferを1.5mlチャージした。この直後からの溶出液1.5mlを

分取した。この得られた溶液を一晩凍結乾燥し、滅菌蒸留水20 μ lを加えて逆相HPLCにより分析した。HPLCにインジェクトした溶液は、40分の1に希釈して分析した。

【0044】

(HPLC測定条件)

カラム：Lichrospher RP-18(Cica-MERCK) 流速：1ml/min

検出波長：260nm 試料注入溶媒：超純水

溶離液A：0.1M TEAA buffer(pH7.0), 10% CH₃CN溶液

溶離液B：0.1M TEAA buffer(pH7.0), 40% CH₃CN溶液

【0045】

表1. HPLC測定のグラジエント条件

	0	30	35	40(min)
A	100	0	0	100(%)
B	0	100	100	0(%)

【0046】

標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトルと目的物のUVスペクトルをそれぞれ図1の(a)と(b)に示す。HPLCの結果、RT=30 min付近に目的物由来のピークが得られたと判断し、HPLC分取を行った。得られた目的物の同定は、MALDI TOF MASSにより行った。その結果を図2に示す。HPLCクロマトグラムからピーク面積から反応率を算出した結果、約90%であり、ほぼ定量的にEL色素の活性エステル6がオリゴDNAと反応した。

【0047】

2. 標識されたオリゴヌクレオチドの検出

次に、以下の表2に示すように、標識されたオリゴヌクレオチドの濃度の異なる溶液を調製した。次いで、その溶液1nLをガラス基板上にスポット(5×5)した。スポット後、ガラス基板を乾燥した。

【0048】

表2.

溶液濃度 (μ M)	標識されたオリゴヌクレオチド の相対濃度(fmol)
110	110
11	11
1	1
0.5	0.5

【0049】

次に、蛍光スキャナーでその検出限界を調べた。結果を図3に示す。(a)、(b)、(c)、(d)は、それぞれ110fmol、10fmol、1fmol、0.5fmolの結果を示す。

ここで、検出機器には、BIO-RAD モレキュラーイメジャー FX Proを用いた。レーザーの波長は488 nm、スキャン間隔は50nmである。

【0050】

(結果)

今回、検出に用いた励起光は488 nmのレーザー光であり、蛍光色素の励起波長は438 nmである。それにも拘わらず、標識されたオリゴヌクレオチドの相対濃度の検出限界は0.5 fmol (500 amol) であり高感度な検出が可能であった。また、DNAとの反応はほぼ定量的であり、反応時間も従来の24時間程度から6時間程度に短縮することが可能であった。さらに、このEL色素は安定であり、15日間、室温下で保存したEL色素を用いて再測定しても、同等の結果が得られた。

【0051】

実施例2.

〈ペプチド類の標識及び検出〉

1. Ac-Lys(EL)-Lys-Lys-Lys(Acr)-Lys-Lys-Lys(Acr)-Lys-Lys-NH₂の合成

(1) Ac-Lys(Mtt)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Resinの合成

(実験操作)

リアクションベッセルにFmoc-NH-SAL Resin 0.15g(0.61mmol/g)を入れ、カートリッジ3, 6にFmoc-Lys(Acr)-OHを0.26gずつ、カートリッジ1, 2, 4, 5, 7, 8にFmoc-Lys(Boc)-OHを0.18gずつ、カートリッジ9にFmoc-Lys(Mtt)-OHを0.23g入れた。後は、Applied Biosystems社の431A peptide synthesizerを用いて合成を行った。Methodは、standard Fmoc法で行い、N末端はアセチル化した。黄色固体のペプチドレジンが得られ、収量は0.30gであった。

【0052】

(2) Ac-Lys(Mtt)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-ResinのMtt基の脱保護、ELの修飾及びレジンからの切り出し、及び側鎖の脱保護

(実験操作)

i) Mtt基の脱保護

スクリー管に1で合成したペプチドレジン0.30g入れ、これに過剰のジクロロメタン (DCM) を加えて30分かけて膨潤させた後、過剰のDCMを窒素ガスで除いた。その後、DCM:TFA:TIPS (トリイソプロピルシラン) =94:1:5の混合溶液4mlを加えて2分攪拌し、窒素ガスで溶媒を除いた。この操作を5回繰り返した後、吸引濾過しDCM、トリエチルアミン、DCMで洗浄後、減圧乾燥させた。

【0053】

ii) メトキシ型有機EL色素の修飾

減圧乾燥させたペプチドレジンにNMP 6mlを加えて30分間攪拌して膨潤させ、トリエチルアミン 0.15mlを加えて攪拌した。さらに、活性エステル (6) 0.2gを加えて室温で24時間攪拌した。その後吸引濾過し、NMP、DCMで洗浄して減圧乾燥させた。

【0054】

iii) レジンからの切り出し及び側鎖の脱保護

減圧乾燥させたペプチドレジンにm-クレゾール 0.08ml、チオアニソール 0.48ml、TFA 3.44mlを加えて室温で1時間半攪拌した。その後、吸引濾過しTFAで洗浄した。TFAを減圧留去した後、氷浴中でエーテル15ml加えた。超音波処理後、しばらく放置し、上澄み液を取り除いた。次に、氷浴中で酢酸エチル15mlを加えて、超音波処理後、しばらく放置した。その後、吸引濾過しエーテルで洗浄後、減圧乾燥させた。

【0055】

黄橙色固体が得られ、収量は0.29 gであった。図4に生成物の精製前(a)及び精製後(b)のHPLCスペクトルを示す。R.T.=12.5min付近のピークのサンプルについてTOF-Mass測定を行ったところEL色素とペプチドの複合体 (EL-Peptide) の分子量:2055.30に対応するピークが2057.33に観測され、目的物の生成を確認した。(Matrix: α -CHCA; 図5)

【0056】

2. ペプチドの検出

実施例1と同様の方法により、ガラス基板上にスポットした標識ペプチドの検出を行った。検出機器には、BIO-RAD モレキュラーイメージャー FX Proを用いた。レーザの波長は488 nm、スキャン間隔は50nmである。

【0057】

(結果)

図6は標識されたペプチドの発光パターンであり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ10fmol、5fmol、1fmol、0.5fmol、0.1fmolの結果を示す。標識されたペプチドの相対濃度の検出限界は0.1 fmol (100 amol) であり高感度な検出が可能であった。また、ペプチドとEL色素との反応はほぼ定量的であった。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】 本発明の検出方法に係る、標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトル

(a)と目的物のUVスペクトル(b)である。

【図 2】本発明の検出方法に係る、標識されたオリゴヌクレオチドのTOF MSスペクトルである。

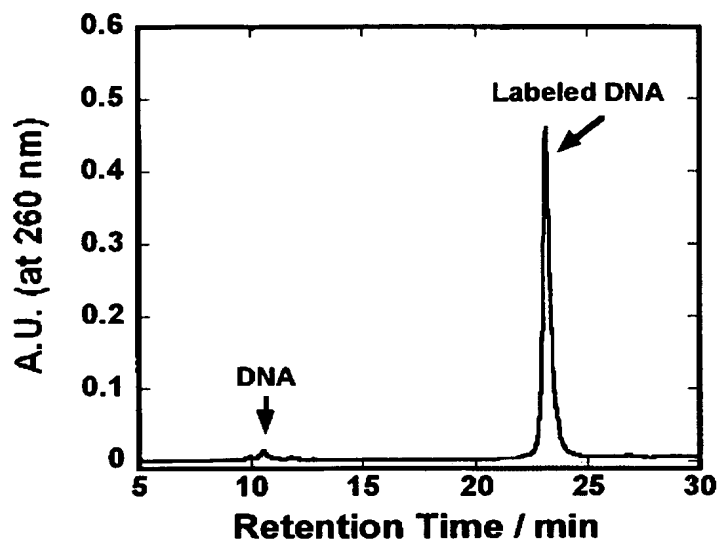
【図 3】本発明の検出方法に係る、標識されたオリゴヌクレオチドの発光パターンであり、(a)、(b)、(c)、(d)は、それぞれ110fmol、10fmol、1fmol、0.5fmolの結果を示す。

【図 4】本発明の検出方法に係る、標識されたペプチドの精製前後のHPLCスペクトルであり、(a)は精製前、(b)は精製後のスペクトルである。

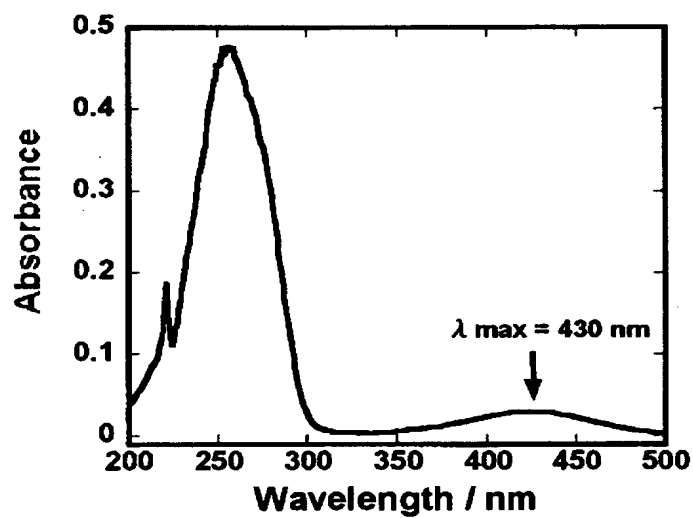
【図 5】本発明の検出方法に係る、標識されたペプチドのTOF MSスペクトルである。

【図 6】本発明の検出方法に係る、標識されたペプチドの発光パターンであり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ10fmol、5fmol、1fmol、0.5fmol、0.1fmolの結果を示す。

【書類名】図面
【図1】

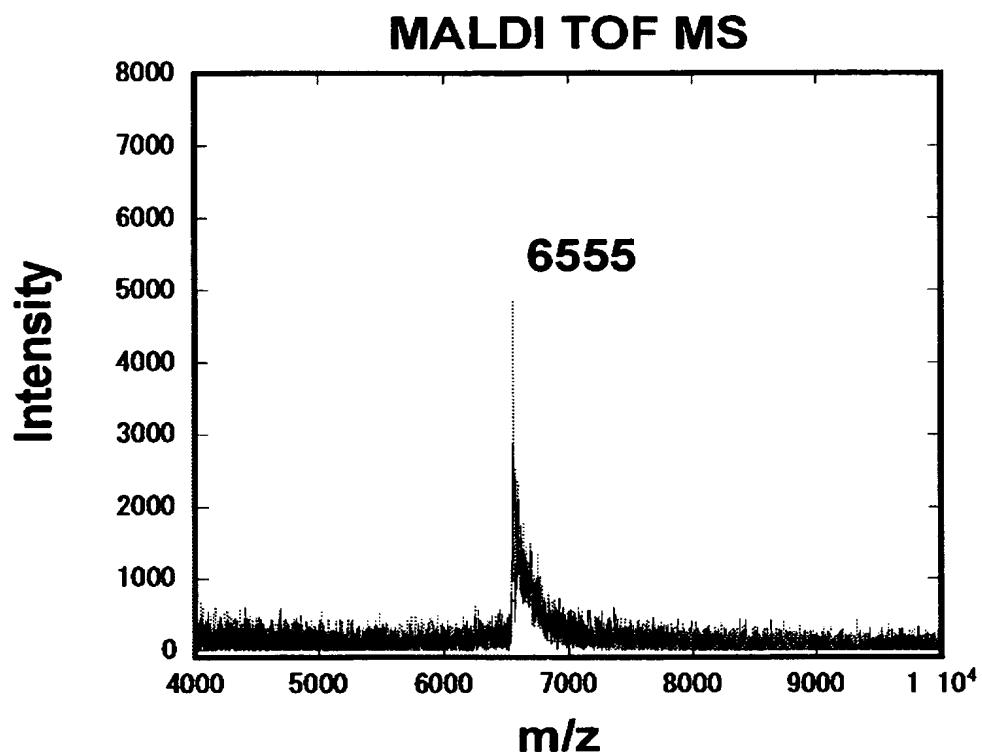


(a)

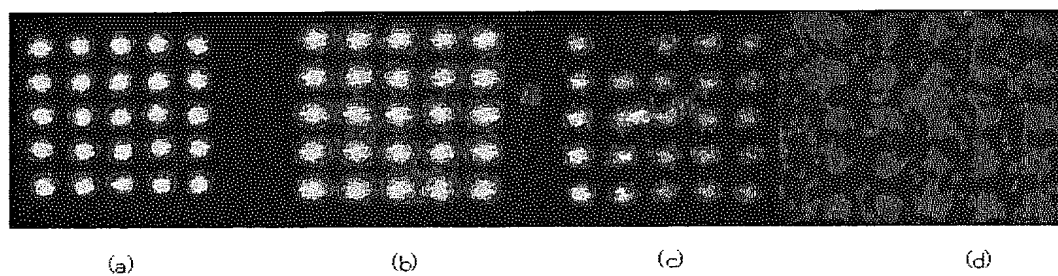


(b)

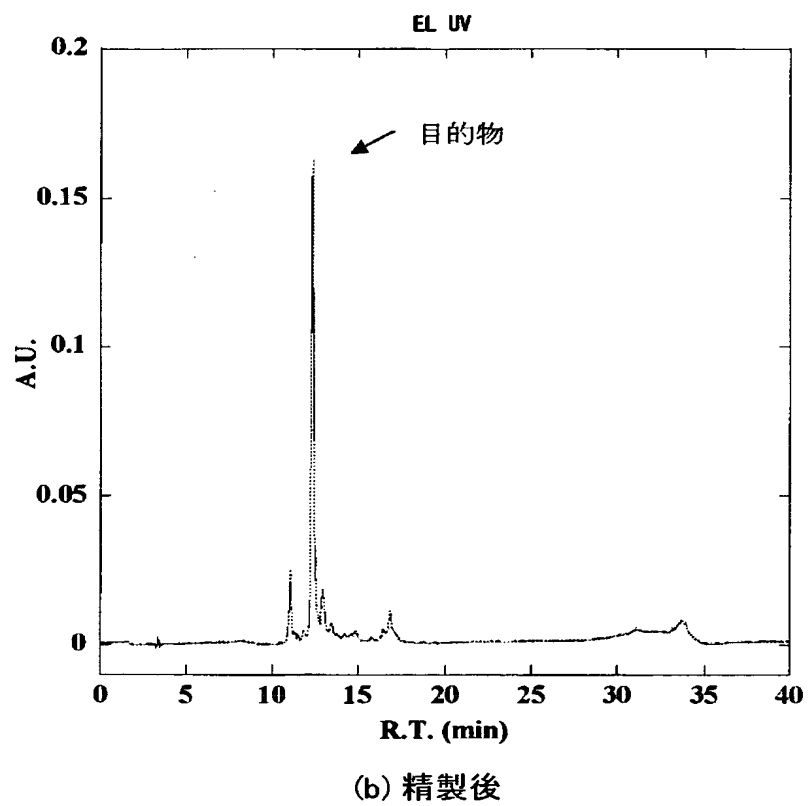
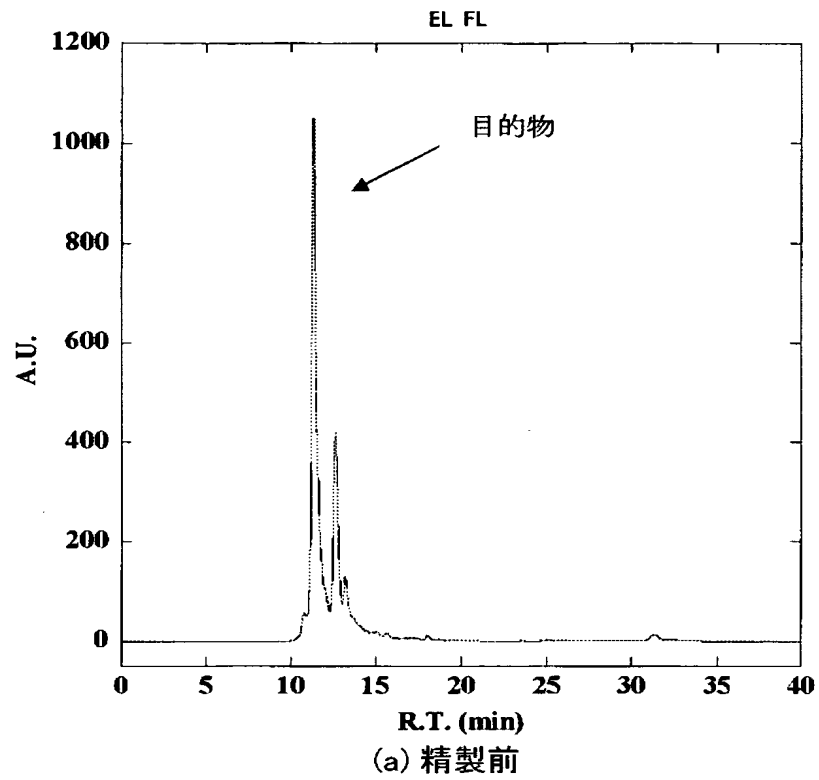
【図 2】

 $m/z = 6565$ Matix : 3-HPA

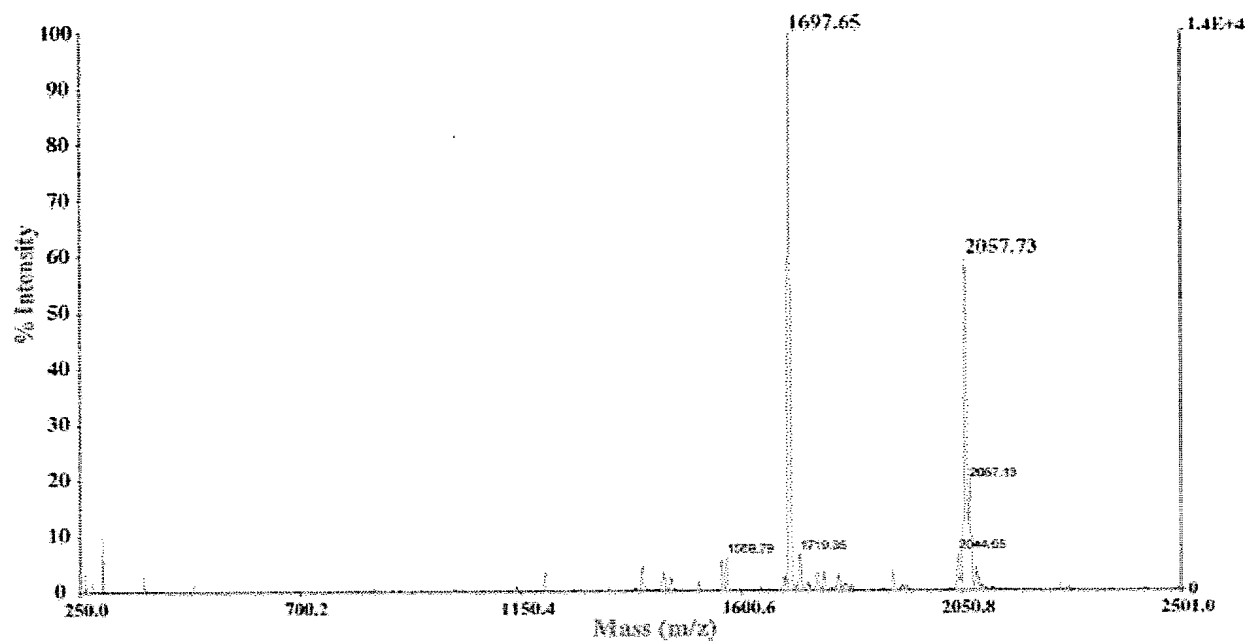
【図 3】



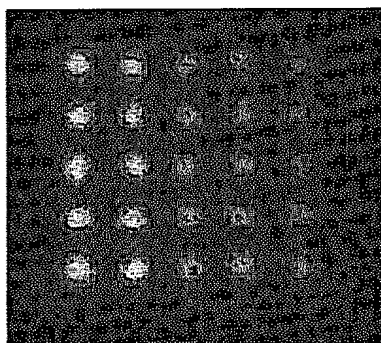
【図 4】



【図 5】



【図 6】



(a) (b) (c) (d) (e)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 より低コストで、高感度の生体高分子の検出方法を提供すること。

【解決手段】 生体高分子試料と有機EL色素とを反応させ、有機EL色素で標識された該生体高分子試料の蛍光を測定する。標識色素に有機EL色素を用いることにより、より低コスト、かつ高感度に生体高分子を検出することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 4 2 7 2 6 8
受付番号	5 0 3 0 2 1 2 0 2 6 7
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 1 月 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【特許出願人】

【識別番号】	503474098
【住所又は居所】	福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9 - 2 8 - 1 2
【氏名又は名称】	磯部 信一郎

【特許出願人】

【識別番号】	501415556
【住所又は居所】	福岡県大野城市大池 2 丁目 1 7 番 5 号
【氏名又は名称】	又賀 駿太郎

【特許出願人】

【識別番号】	596057011
【住所又は居所】	福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1
【氏名又は名称】	竹中 繁織

【代理人】 申請人

【識別番号】	100086405
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】	100091465
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】	石井 久夫

特願 2 0 0 3 - 4 2 7 2 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 4 1 5 5 5 6]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 1 0 月 2 5 日
[変更理由]	新規登録
住 所	福岡県大野城市大池 2 丁目 1 7 番 5 号
氏 名	又 賀 駿 太 郎

特願 2 0 0 3 - 4 2 7 2 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 9 0 4 5 9 5 0]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 5 月 1 6 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消
[統合先識別番号] 5 9 6 0 5 7 0 1 1
住 所 福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1
氏 名 竹中 繁織

特願 2 0 0 3 - 4 2 7 2 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 6 0 5 7 0 1 1]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 5 月 1 6 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合
[統合元識別番号] 3 9 9 0 4 5 9 5 0
住 所 福岡県古賀市舞の里 4 - 2 3 - 2 1
氏 名 竹中 繁織

特願 2 0 0 3 - 4 2 7 2 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 4 7 4 0 9 8]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 2 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9 - 2 8 - 1 2

氏 名

儀部 信一郎